

《原著》

カンピロバクター属菌の検出率が上がる
ドリップシート検査とシートラップ法伊藤 智^{1,2)} 岸本 満¹⁾

要旨

【目的】カンピロバクター属菌は、近年の日本において、もっとも主要な細菌性食中毒の原因物質である。カンピロバクター食中毒予防のために、市販鶏肉の汚染を定量的かつ継続的に分析し、フードチェーン下流の汚染実態を把握する必要がある。しかし、カンピロバクター属菌は、その特性からコントロールすることが難しく、調理時の交差汚染に関する報告は少ない。本研究では、市販鶏肉と密封されるドリップシートに着目し、カンピロバクター属菌汚染状況調査を行った。また、カンピロバクター属菌を高感度に検出するため、食品検体ではなく食品を包んだシートからカンピロバクター属菌をサンプリングする方法を考案した。

【方法】試料は神戸市・明石市の小売店から購入した市販鶏肉（15部位）を用いた。ドリップシート128枚、鶏肉69個を試料とし、カンピロバクター・ジェジュニ/コリ標準試験法（NIHSJ-02:2019）に基づき、増菌培養後、mCCDA 培地で培養し、微好気条件で42℃、48時間培養後のコロニーを測定した。また、鶏肉をシートで包むサンプリング法“シートラップ法”について検出感度を公定法と比較した。

【結果】市販鶏肉のドリップシートからサンプリングした場合、検出率は鶏肉より増菌前は2.6倍、増菌後は1.2倍高かった。鶏肉部位別ではキモの生菌数がドリップシート、生肉ともに最も多く、検出率でもドリップシートではキモが最も高かった。シートラップ法に関して、増菌前は公定法のほうがシートラップ法より生菌数が多い傾向だったが、増菌培養後の増菌数はシートラップ法が高く、増菌培養後の生菌数に明確な差はなかった。

【考察】市販鶏肉のドリップシートと鶏肉を試料とした場合、ドリップシートの方が検出率が高く、汚染実態調査する場合、鶏肉とともにドリップシートも検体にすることで高感度に検出することができる。シートラップ法は公定法より有意に増菌培養時の増菌数が多く、検出感度を高める上で有効なサンプリング法と考えられた。

キーワード：カンピロバクター属菌、細菌性食中毒、交差汚染、ドリップシート、サンプリング法、シートラップ法

1. 背景・目的

カンピロバクター食中毒は日本で発生している細菌性食中毒の中で、2016年以降、発生件数

が最も多く、直近の5年間では年間約300件、約2,000人の患者が報告されている¹⁾。カンピロバクター食中毒は、菌株、環境ストレスによる損傷や宿主の感受性にもよるが、数百～数千個の

1) 名古屋学芸大学大学院栄養科学研究科

2) 神戸学院大学栄養学部

低菌量で感染が成立する²⁾。食中毒患者は、カンピロバクター属菌に汚染された食品を喫食後1～7日（平均3日）で、下痢、腹痛、発熱、頭痛、全身倦怠感等が認められる。

カンピロバクター属菌は長さ0.5～5×幅0.2～0.8 μm 、1～数回螺旋しているグラム陰性菌であり、一端または両端にべん毛を有する。5～10%酸素存在下でのみ増殖可能な微好気性菌である。発育至適温度は35～37℃で、42℃でも発育可能な菌種がある。2013年現在、25菌種8亜種が報告されている²⁾。

カンピロバクター食中毒における患者喫食調査及び疫学調査結果から、主な推定原因食品は生の状態及び加熱不足の鶏肉で、調理中の取扱い不備による二次汚染等も原因だったことが示唆されている³⁾。したがってカンピロバクター食中毒を予防するためには、フードチェーン下流（流通・消費段階）の汚染状況や汚染伝播を定量的・継続的にモニタリングし、リスクアナリシスを行う必要がある。しかし、カンピロバクター属菌は①空気、乾燥、熱に極めて弱く、速やかに死滅する、②微好気環境でしか増加しない、③実験的に長期間の培養又は大気中に曝露されると急速に菌形態をらせん状から球状に変化させ、すみやかにVBNC（Viable But Non Culturable cells；生きているが人工培地で培養できない仮死状態）となる、などの特性を有し、人工培地を用いた菌数測定法では、感染、発症に至る実際の菌数を把握できない恐れがある⁴⁾。特に調理時の二次汚染については、アンケート調査に基づく二次汚染発生確率の推計値が報告⁵⁾されているが、標準菌などを用いたモデル実験による汚染伝播率の報告は少ない。カンピロバクター食中毒の発生を未然に防ぐためには、フードチェーンの下流となる調理現場の汚染実態を明確に捉えた上で伝播実態や伝播率、そして加熱等による生残・死滅菌数の定量的評価が必要となる。

一般に市販鶏肉は発泡樹脂製トレイに入れられ、ラップフィルムで密閉され販売される。その際、鶏肉の肉汁を吸着し、見た目をよくする目的で、ドリップシートが敷かれていることが多い。ドリップシートには、鶏肉表面のカンピ

ロバクター属菌など一次汚染微生物が付着している。調理時にドリップシートの取り扱いが不適切だと、二次汚染が発生し、食中毒発生のリスクが高くなる。そこで市販鶏肉製品のドリップシート中のカンピロバクター属菌汚染の実態を調査した。

次に、食鳥処理工程ではカンピロバクター属菌が、糞便や鶏の腸内容物を介して鶏肉に汚染する⁶⁾ことから鶏肉部位により、カンピロバクター属菌数や汚染率が異なると予測されるので食肉部位別のカンピロバクター属菌数と汚染率（検出率）を調査した。

また鶏肉製品からカンピロバクター属菌を検出するためのサンプリング法“シートラップ法”を考案、検出感度を比較した。

2. 試料および方法

2-1. 試料

試料は神戸市・明石市計5店舗の小売店で2017年5月から2018年8月までの15カ月間に購入した市販鶏肉（15部位：キモ、ササミ、手羽中、ムネ、モモ、肩小肉、ガラ、心臓、砂肝、セセリ、手羽先、手羽元、ボタン軟骨、ヒザ軟骨、ヤゲン軟骨）を調査した。試験に供したのは、市販鶏肉に敷かれたドリップシート128枚（15部位）、鶏肉（生肉）69個（13部位：ガラ、ボタン軟骨除く）である。

2-2. 増菌培地

カンピロバクター属菌増菌培地はニュートリエントブイヨン No.2（CM0067関東化学）12.5gに精製水475mL、馬溶血液（日本バイオテスト）25mL、プレストンカンピロバクター選択サプリメント（SR0117関東化学）1バイアル、カンピロバクター発育サプリメント（SR0232関東化学）1バイアルを混合したプレストン培地を用いた。

2-3. 選択培地

カンピロバクター属菌選択培地は、カンピロバクター血液無添加選択寒天基礎培地（CM0739関東化学）22.75gに精製水500mL、

CCDA サプリメント (SR0155 関東化学) 1 バイアルを混合した mCCDA 培地を用いた。

2-4. 生菌数測定と定性試験

カンピロバクター・ジェジュニ / コリ標準試験法 (NIHSJ-02:2019)⁷⁾ に準じ、ドリップシート及び鶏肉 25 g を無菌的に採取、プレストン培地 10 mL 及び 100 mL を加えて均一化した 0.1 mL を mCCDA 培地に塗布、微好気 (O_2 : 6 %、 CO_2 : 11 %、 N_2 : 83 %) で 42℃、48 時間培養後、菌数を測定した。

また、均一化後の試料液を 37℃、16 時間増菌培養後、0.1 mL を mCCDA 寒天培地に塗布、上記と同条件で培養後、菌数を測定した。

増菌前、増菌後とも mCCDA 培地上に 1 個以上コロニーが生育したとき (ドリップシートの場合 100 CFU / シート以上、鶏肉の場合 50 CFU / g 以上)、カンピロバクター属菌陽性とした。

2-5. シートラップ法

公定法⁷⁾ のように試料と増菌培地の希釈液を作成する方法より、感度高くサンプリングする方法を検討するため、市販のペーパータオル (パルプ 100 %、蛍光塗料・香料不使用) を 110 × 110 mm のシート状にして生肉 25 g を包み、10 分間静置後、プレストン培地 10 mL を加えて均一化したものを試料とする方法を考案した。“シートラップ法”と名付けたこの方法の検出感度を評価するため、市販鶏肉 (キモ) からシートラップ法及び公定法に準じたサンプリング法で試料液を調製、増菌前・増菌後のカンピロバクター属菌数を測定した。

3. 結果

3-1. ドリップシート検出率

市販鶏肉 15 部位中 14 部位のドリップシートからカンピロバクター属菌が検出された。また、増菌前のドリップシート 128 枚のうち 66 枚 (52 %) から、また増菌後の試料 103 検体 (80 %) からカンピロバクター属菌が検出された (表 1)。一方、増菌前の鶏肉は 69 個のうち 14 個 (20 %) から、また増菌後は 46 個 (67 %) から検出された。増菌前の試料では、ドリップシートの検出率は鶏肉の 2.6 倍、増菌後の試料では鶏肉の 1.2 倍だった。なお、ドリップシート 128 検体のうち、鶏肉と同梱されていた 69 試料では、増菌前の 31 枚 (45 %)、増菌後の 52 枚 (75 %) からカンピロバクター属菌が検出された (表 1)。

3-2. 鶏肉部位別の生菌数と検出率

鶏肉部位別の生菌数と検出率を比較するため、表 1 で示した検体のうち、10 検体以上検査した 5 部位 (キモ、ムネ、ササミ、手羽中、モモ) のドリップシートと鶏肉の増菌前陽性検体の平均生菌数及び増菌後検出率を表 2 に示した。キモの増菌前平均生菌数は、ドリップシートで $3.6 \pm 0.6 \log CFU / \text{シート}$ 、キモで $2.9 \pm 0.6 \log CFU / g$ で 5 部位中最も高値だった。またキモのドリップシート増菌後検出率は 90 % だったが、キモ増菌後は 77 % だった。

鶏肉のうち増菌後検出率が最も高かったのは手羽中 (80 %) だった。モモはドリップシート増菌後検出率 (68 %) 及びモモ増菌後検出率 (60 %) とともに最低値で、鶏肉 5 部位中ではカンピロバクター属菌検出率は比較的低値だった。

表 1 カンピロバクター属菌検出率

試料	増菌前／後	検出率	[陽性数／検体数]
ドリップシート	増菌前	52%	[66／128]
		(45%) *	(31 * ／69)
	増菌後	80%	[103／128]
		(75%) *	(52 * ／69)
鶏肉	増菌前	20%	[14／69]
	増菌後	67%	[46／69]

* ドリップシート 128 検体のうち鶏肉と同梱されていた 69 検体の検出率と陽性数

3-3. シートラップ法の評価

表1に示したようにドリップシートを検査したほうが鶏肉を検査するよりカンピロバクター属菌を高感度で検出することができた。

鶏肉とドリップシートを同梱するとドリップシートが肉汁などを吸収、同時にカンピロバク

ター属菌を含む一次汚染菌もドリップシート中に取り込まれる。ドリップシート内部はカンピロバクター属菌が生残しやすい水分量と微好気条件が保持されるため、ドリップシート検体からの検出率が高くなると予測した。

この予測をもとにペーパータオルに鶏肉表面

表2 鶏肉部位別 カンピロバクター増菌前平均生菌数と増菌後検出率

鶏肉部位	ドリップシート		鶏肉	
	増菌前平均生菌数±SD/陽性検体 (logCFU/シート/陽性検体)	増菌後検出率 [陽性/検体]	増菌前平均生菌数±SD/陽性検体 (logCFU/g/陽性検体)	増菌後検出率 [陽性/検体]
キモ	3.6±0.6 / 12	90% [18/20]	2.9±0.6 / 6	77% [10/13]
ムネ	2.8±0.4 / 7	84% [16/19]	1.9±0.2 / 1	71% [10/14]
ササミ	2.9±0.6 / 8	79% [15/19]	0	60% [6/10]
手羽中	2.5±0.1 / 5	82% [9/11]	2.1±0.1 / 1	80% [4/ 5]
モモ	2.9±0.5 / 7	68% [17/25]	2.3±0.2 / 3	60% [9/15]
平均 [計]	2.9±0.6 / 39	80% [75/94]	2.4±0.5 / 11	68% [39/57]

表3 シートラップ法及び公定法でサンプリングしたときの増菌培養前後の生菌数

試料	サンプリング法	増菌前生菌数	増菌後菌数
		(シート：logCFU/シート公定法： logCFU/25g)	(シート：logCFU/シート公定法： logCFU/25g)
キモ a	シートラップ法	2.6	5.8
	公定法	3.5	4.9
キモ b	シートラップ法	0.0	5.6
	公定法	3.8	SW
キモ c	シートラップ法	3.1	6.7
	公定法	+++	7.0
キモ d	シートラップ法	2.0	5.7
	公定法	3.8	5.5
キモ e	シートラップ法	0.0	4.0
	公定法	0.0	5.7
キモ f	シートラップ法	2.7	SW
	公定法	3.8	SW
キモ g	シートラップ法	0.0	SW
	公定法	3.3	4.6
平均 *	シートラップ法	2.8	6.2
	公定法	3.7	6.4
SD *	シートラップ法	0.4	0.9
	公定法	0.2	0.8

+++：300CFU 以上 SW：遊走（スウォーミング）のため、コロニー測定不可

* コロニー未検出及び、スウォーミングにより測定不可の試料を除き計算

の肉汁を吸収させ、一次汚染菌を回収、とりわけカンピロバクター属菌が生残しやすい環境でサンプリング操作ができる“シートラップ法”を考案した。

シートラップ法の検証は部位別検出率及び生菌数が最も高かったキモ（表2）を試料に用いた。

シートラップ法ではキモ試料から増菌前で $2.8\log \pm 0.4SD$ の生菌が検出されたが、公定法ではシートラップ法の約10倍の $3.7\log \pm 0.2SD$ の生菌が検出された（表3）。増菌前及び増菌後の

検出生菌数を図1に示した。

増菌後の生菌数は、同じ試料間で比較した場合、キモaではシートラップ法が、キモc、eは公定法が高くなった。増菌前後の菌数増加を比較すると、キモe以外の試料ではシートラップ法が公定法より増菌率が高い傾向となり、平均値でも公定法は $3.7\log CFU$ から $6.4\log CFU$ に増加したが、シートラップ法は $2.8\log CFU$ から $6.2\log CFU$ に増加した。各試料の増菌前・増菌後の生菌数をプロットしたところ（図2）、シートラップ法のキモa、c、dと公定法のキモa、d、

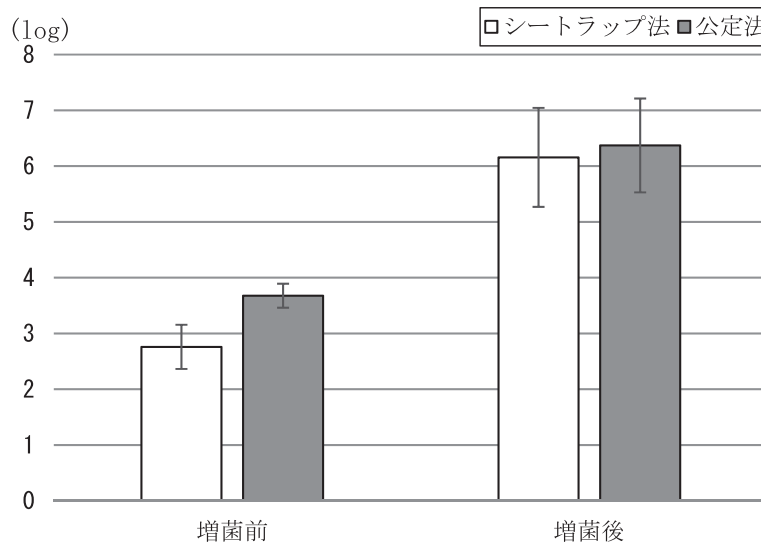


図1 シートラップ法及び公定法でサンプリングしたときの増菌培養前後の平均生菌数

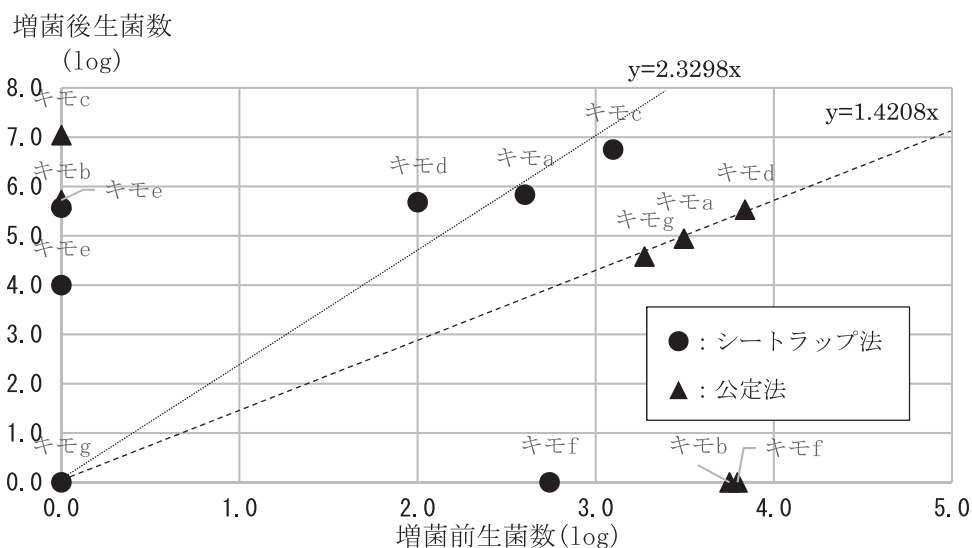


図2 シートラップ法及び公定法でサンプリングしたときの増菌前・増菌後生菌数の分布

gがそれぞれ直線上に分布した。回帰式はシートラップ法が $y=2.3298x$ 、公定法が $y=1.4208x$ で、シートラップ法でサンプリングした時、増菌率が公定法の約1.6倍高くなることが示唆された。

4. 考察

市販鶏肉のカンピロバクター属菌検出率はドリップシートで80% (増菌前52%)、鶏肉で67% (増菌前20%) だった。汚染実態を調査した先行研究では、静岡県内の小売店 (8店舗) で市販国産鶏肉33検体のうち69.7% (23検体) からカンピロバクター属菌が検出され⁸⁾、また、富山県で購入した市販鶏肉37検体のうち、62.2% (23検体) からカンピロバクター属菌が検出された⁹⁾。本研究の検出率は先行研究と同程度だったが、ドリップシートからの検出率は高く、カンピロバクター属菌を高感度で検出できることが示唆された。これはドリップシートには同梱された生肉に付着した一次汚染物が伝播しており、吸収した肉汁が微好気環境を作りカンピロバクター属菌が生残・増殖しやすいためと考ええる。

また、市販時に同梱されていた鶏肉とドリップシートからの検出率を比較すると、増菌後のドリップシートの方が、増菌後の鶏肉よりも検出率が高く、高感度で検出できた。このことから、市販鶏肉の汚染実態調査ではドリップシートを検査対象に加えることで汚染実態の把握に有用となることが示唆された。

次に、鶏肉の部位別にドリップシートの増菌前の生菌数および検出率を検証した。10検体以上検査した5部位 (キモ、ムネ、ササミ、手羽中、モモ) のドリップシート全94検体中39検体 (41%) からカンピロバクター属菌が検出され、平均生菌数は $2.9 \pm 0.6 \log \text{CFU}$ だった。同梱の鶏肉全57検体からは11検体 (19%) からカンピロバクター属菌が検出され、平均生菌数は $2.4 \pm 0.5 \log \text{CFU}$ だった。

部位別ではキモが最も多く、ドリップシートから平均で $3.6 \log \text{CFU}$ 、キモから平均で $2.9 \log \text{CFU}$ のカンピロバクター属菌が検出さ

れた。カンピロバクター食中毒は 10^2CFU の菌数で感染発症するとされる。他の部位についても、カンピロバクター食中毒の感染発症の原因となる菌数が検出されており、感染発症のリスクがあると考えられた。このことからドリップシートが交差汚染の汚染源となり、食中毒発症の原因となる可能性が認められた。カンピロバクター食中毒予防のため、調理中のドリップシートの取り扱いについて、広く注意喚起する必要がある。

これまでの結果からドリップシートは、鶏肉よりもカンピロバクター属菌検出率が高く、より多くの生菌数を検出することが分かった。このことからドリップシートなどシート状のもので鶏肉の肉汁を吸収することにより、シート内部が微好気環境となりカンピロバクター属菌が検出されやすくなると考えられた。このドリップシートの特徴を基に、ペーパータオルを用いたシートラップ法でのサンプリング法を考案し、カンピロバクター属菌の検出率および生菌数について検討した。シートラップ法によるサンプリングを行うと、増菌前は公定法でサンプリングした方が検出菌数が高い傾向がみられたが、増菌後の菌数に差はみられなかった。増菌培養後の平均増菌数はシートラップ法で $3.4 \log \text{CFU}$ 、公定法で $2.7 \log \text{CFU}$ となり、増菌前・増菌後生菌数分布図から算出した回帰式から増菌率が高いことが示唆された。これは公定法の場合は、増菌培養時に鶏肉のたんぱく質や脂質がストマッキング時に混濁するが、シートラップ法では混濁する成分が少なく、食品成分や一次汚染微生物の影響を受けにくく、カンピロバクター属菌が増菌しやすい環境だったと考えられた。

5. 結論

市販鶏肉のカンピロバクター属菌汚染実態調査においては、ドリップシートも検体にすることで、高感度に検出することができる。また、鶏肉をシートで包んでサンプリングする“シートラップ法”は増菌培養後の菌数増加率が高く、微量汚染検体でもシートラップ法と増菌培養

を組み合わせることで、検出されやすくなり、汚染実態調査に有用であることが示唆された。シートラップ法でサンプリングすると、鶏肉の成分などストマッキング時に含まれる夾雑物の割合が少なくなり、効率よく増菌したと考えられた。

6. 謝辞

本研究は科研費19K10587、並びに神戸学院大学研究助成金の助成を受けたものである。

参考文献

- 1) 厚生労働省. 食中毒統計資料
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuchu/04.html
- 2) 公益社団法人日本食品衛生協会. 食品衛生検査指針 微生物編 2015. p312
- 3) 厚生労働省. カンピロバクター食中毒予防について (Q&A) <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000126281.html>
- 4) 川森文彦、柏木美智子、佐野世乃ら. カンピロバクターの菌数測定法の検討及び食品におけるカンピロバクター汚染の実態調査ーリアルタイム PCR 法による *Campylobacter jejuni* の菌数測定ー. 静岡県環境衛生科学研究所報告 2003年; Vol46: p1-6
- 5) 食品安全委員会. 微生物・ウイルス評価書 鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニ／コリ 2009年
- 6) 食品安全委員会. 食品健康影響評価のためのリスクプロファイルー 鶏肉等における *Campylobacter jejuni/coli* ー2018年: p10
- 7) 国立医薬品食品衛生研究所. カンピロバクター・ジェジュニ／コリ標準試験法 NIHSJ-02: 2019
- 8) 飯田奈都子、渡邊朋恵、佐原啓二ら. 食品保存環境におけるカンピロバクター生残性に関する研究. 静岡県環境衛生科学研究所報告 2012年; Vol55: p21-25
- 9) 嶋智子、磯部順子、嶋一世 et al. 富山県における市販鶏肉のカンピロバクターおよびサルモネラ属菌汚染実態調査. 富山県衛生研究所年報 2012年; Vol67: p120-123

Abstract

Drip sheet investigation and Sheet-Wrap method to increase *Campylobacter* spp. detection rate

Satoshi Ito^{1, 2)} and Michiru Kishimoto¹⁾

[Purpose] In recent years, *Campylobacter* spp. have been the most common causative agents of bacterial food poisoning in Japan. To evaluate downstream contamination in the food chain for preventing bacterial food poisoning by *Campylobacter* spp., chicken meat suspected to be contaminated is generally subjected to ongoing quantitative analyses. However, studies on cross-contamination by *Campylobacter* spp. during cooking are limited because *Campylobacter* spp. are difficult to cultivate due to their characteristics. In this study, we focused on a drip sheet placed beneath commercially available chicken meat and investigated its contamination by *Campylobacter* spp. To increase the sensitivity for detecting *Campylobacter* spp., we developed a sample preparation method from the paper towel in which the chicken meat had been wrapped, rather than from the chicken meat itself.

[Materials and methods] Samples were collected from 15 chicken meat portions purchased from retail shops in Akashi and Kobe, Japan. One hundred and twenty-eight drip sheet pieces and 69 chicken meat pieces were enriched and spotted onto a modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar (mCCDA) plate, and then incubated at 42°C for 48 h in a microaerophilic atmosphere. Cultivated colonies were enumerated based on a Japanese standard method established by the National Institute of Health Sciences Japan – The Methods for the Microbiological Examination of Foods-02:2019 for the detection of *Campylobacter jejuni/coli* (NIHSJ-02). The samples were then subjected to a confirmation test to identify *Campylobacter* spp. The developed sample preparation method from the paper towel (Sheet-Wrap method) was compared to the standard method with respect to sensitivity for *Campylobacter* spp. detection.

[Results] The *Campylobacter* spp. detection rate of the drip sheet was higher than that of the chicken meat both before and after enrichment culture; 2.6 and 1.2 times higher, respectively. As for the chicken meat portions, the viable bacterial counts of both the drip sheet and chicken meat were highest for the liver and the detection rates for both the drip sheet were highest for liver. The viable bacterial counts before enrichment tended to be higher with the standard method than with the Sheet-Wrap method, but the growth rate of enriched bacteria was higher, after the enrichment, with the Sheet-Wrap method. No significant difference was observed in viable bacterial counts after the enrichment culture.

[Conclusion] The drip sheet placed beneath commercially available chicken meat yielded a higher detection rate than chicken meat. This result implies that both the drip sheet and chicken meat should be collected as samples to increase the detection rate when evaluating downstream contamination in the food chain. The Sheet-Wrap

1) Graduate School of Nutritional Sciences, Nagoya University of Arts and Sciences Graduate School

2) Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin University

method yielded a higher number of enriched bacteria than the standard method during the enrichment culture, suggesting that this might be an effective sampling method for increasing detection sensitivity.

Key Words: Campylobacter spp., bacterial food poisoning, cross-contamination, drip sheet, sample preparation method, Sheet-Wrap method